

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian tentang pengaruh pemberian tepung *Lumbricus rubellus* terhadap kadar enzim transaminase hepar *Rattus norvegicus* yang terinfeksi *Salmonella typhi* ini merupakan penelitian eksperimental menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) pola faktorial (*Completely Random Design* pola faktorial) dengan 2 faktor dan 4 ulangan. Faktor pertama adalah dosis pemberian tepung *Lumbricus rubellus* yang terdiri atas 3 taraf perlakuan. Faktor kedua adalah lama pemberian tepung *Lumbricus rubellus* yang terdiri atas 2 taraf perlakuan. Perlakuan dalam penelitian ini adalah hasil kombinasi antara faktor dari seluruh taraf perlakuan yaitu terdiri atas 6 perlakuan dan 2 kontrol (kontrol positif dan negatif) masing-masing terdiri atas 4 ulangan.

Faktor I adalah dosis tepung *Lumbricus rubellus*, yaitu:

A= dosis 32%

B= dosis 48%

C= dosis 60%

Faktor II adalah lama pemberian tepung *Lumbricus rubellus*, yaitu:

1 = selama 7 hari

2 = selama 14 hari

Tabel 3.1 Kombinasi Perlakuan antara Dosis dan Lama Pemberian Tepung *Lumbricus rubellus*

| Dosis (%) | Lama Pemberian (hari) |
|-----------|-----------------------|
| 32 | 7 |
| 48 | |
| 60 | |
| 32 | 14 |
| 48 | |
| 60 | |

3.2 Variabel Penelitian

Variabel pada penelitian ini meliputi:

1. Variabel bebas : ada 2 variabel yaitu variabel A dan variabel B. Variabel A adalah konsentrasi pemberian tepung *Lumbricus rubellus* yang terdiri atas 3 dosis yaitu 32%, 48%, dan 60%. Variabel B adalah lama pemberian tepung *Lumbricus rubellus*, yaitu 7 hari dan 14 hari.
2. Variabel terikat : kadar enzim transaminase hepar *Rattus norvegicus* yang terinfeksi *Salmonella typhi*.
3. Variabel kendali : *Rattus norvegicus* Strain Sprague-Dawley jantan

umur 2,5 bulan dengan berat badan 300 gram berjumlah 32 ekor.

3.3 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari sampai Mei 2011, bertempat di Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Biosistem Jurusan Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.

3.4 Populasi dan Sampel

Bakteri uji yang digunakan adalah *Salmonella typhi* dengan kepadatan $8,57 \times 10^5$ dalam 0,5 ml suspensi. Hewan uji yang digunakan adalah *Rattus norvegicus* Strain Sprague-Dawley jantan umur 3-4 bulan dengan berat badan ± 300 gram sebanyak 32 ekor.

3.5 Alat dan Bahan

35.1 Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu adalah cawan petri, tabung reaksi, rak tabung reaksi, *beaker glass*, labu ukur, *micropipet*, bunsen, *incubator*, *autoclave*, *oven*, *hot plate magnetic stirrer*, timbangan analitik, jarum ose, pinset, spatula, karet gelang, kertas HVS bekas, kapas, kain kasa, gelas ukur, kertas label, gunting, aluminium foil, tissue, spidol permanen, mortar, kandang hewan coba

(bak plastik), kawat, tempat makan dan minum tikus putih, ayakan tepung, alat pencekok oral (sonde), seperangkat alat bedah, tabung EDTA, spektrofotometer, spuit, dan tabung ependorf.

3.5.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu biakan murni bakteri *Salmonella typhi*, tepung *Lumbricus rubellus*, *Ratus norwegicus*, medium SSA, medium NB, BaCl_2 1%, H_2SO_4 1%, aquades steril, alkohol 70%, NaCl fisiologis, spiritus, pakan tikus putih (pellet), serutan kayu, air PAM, larutan EDTA, dan reager kit SGPT dan SGOT.

3.6 Prosedur Penelitian

3.6.1 Pembuatan Tepung *Lumbricus rubellus*

Pembuatan tepung *Lumbricus rubellus* dilakukan dengan menggunakan metode Julendra dan Sofyan (2007) dengan modifikasi. Adapun langkahnya sebagai berikut. Pertama kali dilakukan identifikasi spesies, maksudnya agar cacing yang diproses benar-benar spesies yang dimaksud yaitu *Lumbricus rubellus*. *Lumbricus rubellus* dibersihkan dari tanah dan kotoran lainnya yang menempel, kemudian dicuci dengan air mengalir. *Lumbricus rubellus* dioven dalam suhu 50°C selama 6 jam. *Lumbricus rubellus* dihaluskan dengan cara ditumbuk hingga menjadi tepung cacing kemudian diayak.

3.6.2 Sterilisasi alat

Metode sterilisasi adalah sebagai berikut:

a. Sterilisasi Kering

Sterilisasi kering meliputi cara sterilisasi dengan api langsung dan cara sterilisasi dengan oven pemanas.

- 1) Sterilisasi dengan api langsung, sterilisasi ini dilakukan terhadap peralatan seperti jarum ose, pinset, spatel, mulut tabung biakan dan batang pengaduk. Sesudah disterilkan peralatan tersebut didinginkan terlebih dahulu sebelum digunakan.
- 2) Sterilisasi dengan oven pemanas, oven pemanas digunakan untuk sterilisasi peralatan gelas yang tidak berskala, seperti cawan petri, tabung reaksi, dan pipet. Alat-alat yang akan disterilkan dimasukkan ke dalam oven setelah suhu mencapai 160°C selama 1-2 jam.

b. Sterilisasi Basah

Sterilisasi dilakukan menggunakan autoklaf. Peralatan yang disterilkan dengan sterilisasi basah diantaranya sterilisasi medium, gelas ukur, dan pipet tetes. Proses sterilisasi ini dilakukan pada suhu 121°C dengan tekanan 15 atmosfer selama 15 menit.

3.6.3. Pembuatan Media dan Pembuatan Biakan Bakteri

Salmonella typhi

3.6.3.1 Pembuatan Media NB (*Nutrien Broth*)

Media NB dibuat berdasarkan aturan yang tertera pada kemasan yaitu sebagai berikut. Sebanyak 18 gram NB dilarutkan dalam 1 liter aquades. Larutan dipanaskan dan diaduk dalam *beaker glass* menggunakan *hot plate magnetic stirrer* hingga homogen. Dituang dalam tabung reaksi dan disterilkan terlebih dahulu sebelum digunakan.

3.6.3.2 Pembuatan Media SS (*Salmonella-Sigella*) Agar Plate

Langkah-langkah yang dilakukan dalam pembuatan medium SS agar plate berdasarkan peraturan pada kemasannya adalah sebagai berikut. Bubuk SSA ditimbang seberat 63 gram dan dilarutkan dalam 1 liter aquades. Larutan SSA dipanaskan dan diaduk dalam *beaker glass* menggunakan *hot plate magnetic stirrer* hingga homogen dan didinginkan dalam *waterbath* pada suhu 45-47°C. Diletakkan dalam tabung reaksi masing-masing diisi 10 ml dan disterilkan terlebih dahulu sebelum digunakan.

3.6.3.3 Pembuatan Larutan Standart McFarland 0,5

Larutan McFarland 0,5 digunakan sebagai pembanding kekeruhan biakan bakteri dalam medium cair dengan kepadatan antara 1×10^7 sel/ml - 1×10^8 sel/ml (Quelab, 2005). Urutan kerja pembuatan larutan McFarland 0,5 menurut Nurhayati (2007) adalah sebagai

berikut. Sebanyak 0,05 ml Barium Klorida (BaCl_2) 1% dalam akuades ditambahkan 9,95 ml Asam Sulfat (H_2SO_4) 1%. Kemudian disimpan di tempat yang terhindar dari cahaya matahari langsung.

3.6.3.4 Pembuatan Kultur

3.6.3.4.1 Pembuatan Kultur Stok

Bakteri *Salmonella typhi* yang telah diidentifikasi dibiakkan lagi pada medium SSA miring. Diinkubasi dengan suhu 37°C selama 2 x 24 jam. Kultur ini tahan disimpan hingga 3 bulan dalam suhu 4°C (dalam media NA) (Benson, 2001). Metode ini dapat diulang untuk peremajaan.

3.6.3.4.2 Pembuatan Kultur Kerja (Suspensi Bakteri *Salmonella typhi*)

Salmonella typhi dari kultur stok dibiakkan lagi pada medium cair NB (*Nutrien Broth*) dan disimpan dalam inkubator selama 2 x 24 jam pada suhu 37°C . Setelah 2 hari dibiakkan, kekeruhan antara *Salmonella typhi* yang dikultur dalam medium cair dibandingkan dengan larutan standar McFarland 0,5. Berdasarkan Quelab (2005), 0,5 Mc Farland setara dengan $1 \times 10^7 - 1 \times 10^8$ sel/ml. *Salmonella typhi* yang dikultur pada NB diusahakan lebih keruh dibanding larutan standar McFarland 0,5 kemudian konsentrasi dihitung dengan

spektrofotometer sampai kepadatan menjadi $8,57 \times 10^5$ sel/ml (Fauzia dan Larasati, 2008).

3.6.3.4.3 Penentuan Kepadatan Bakteri *Salmonella typhi* Serta Lama Penginfeksian yang Diberikan Secara per Oral

Penentuan kepadatan bakteri *Salmonella typhi* adalah dengan membandingkan berat badan tikus putih rata-rata 300 gram dengan berat badan manusia rata-rata 70 kg, kemudian dikalikan kepadatan rata-rata bakteri yang sudah bisa menginfeksi manusia. Maka dihitung dengan $\frac{300}{70000} \times 10^8 = 4,2 \times 10^5$ bakteri per mililiter. Dengan mempertimbangan kapasitas lambung tikus putih, maka volume diperkecil menjadi $\frac{1}{2}$ ml dan kepadatan dikalikan 2 menjadi $8,57 \times 10^5$ dalam $\frac{1}{2}$ ml suspensi bakteri.

Penentuan lama inkubasi bakteri *Salmonella typhi* hingga menimbulkan demam pada tikus putih juga dikalibrasikan dengan masa inkubasi bakteri *Salmonella typhi* pada manusia dengan membandingkan umur tikus putih dengan manusia (diperkirakan umur maksimal manusia 100 tahun, dan tikus putih 3 tahun, masa inkubasi bakteri *Salmonella typhi* hingga menimbulkan demam pada manusia adalah 7 hari). Maka dihitung dengan $\frac{3}{100} \times 7 = 1,4$ hari atau sekitar 34 jam.

3.6.4 Pengenceran Tepung *Lumbricus rubellus*

Konsentrasi yang digunakan sebesar 32%, 48% dan 60% (w/v) tepung *Lumbricus rubellus* dalam larutan aquades. Konsentrasi ini didasarkan pada penelitian Ratriyani (2000), dimana konsentrasi tepung cacing yang paling efektif dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Salmonella typhi* secara *in vitro* adalah 32%. Sedangkan pada penelitian yang menggunakan hewan coba (*in vivo*) mungkin potensi antimikroba yang terkandung di dalam tepung *Lumbricus rubellus* akan termodifikasi oleh metabolisme tubuh sehingga dalam penelitian ini konsentrasi dinaikkan dan dibuat variasi seperti yang tersebut di atas. Pembuatan masing-masing konsentrasi tersebut dilakukan dengan cara pengenceran tepung cacing dari konsentrasi 100%.

3.6.5 Pelaksanaan Penelitian

3.6.5.1 Persiapan Hewan Coba

Rattus novergicus diaklimatisasi di laboratorium selama 2 minggu, diberi makan dan minum secara *ad libitum*. Kemudian diambil darahnya untuk dilakukan tes serologis yang pertama (tes widal). Tes tersebut untuk mengetahui status kenormalan tikus (tidak mengalami *tipod fever*).

Selanjutnya 24 ekor tikus kelompok perlakuan dan 4 ekor tikus kontrol positif diinfeksi bakteri *Salmonella typhi* dengan cara *Rattus novergicus* dicekoki bakteri dengan kepadatan $8,57 \times 10^5$ sel/ ml

sebanyak 0,5 ml. Setelah 34 jam kemudian *Rattus novergicus* diambil darahnya untuk dilakukan tes serologis ke dua (tes widal) untuk mengetahui positif atau negatif terinfeksi bakteri *Salmonella typhi*.

3.6.5.2 Penentuan Perlakuan

Penelitian ini terdiri atas 2 kelompok kontrol (kontrol positif dan negatif) serta 6 kombinasi perlakuan masing-masing 4 kali ulangan. Kelompok kontrol positif yaitu kelompok tikus putih yang terinfeksi *Salmonella typhi* tanpa perlakuan pemberian tepung *Lumbricus rubellus*. Kelompok kontrol negatif yaitu kelompok tikus putih yang tidak terinfeksi *Salmonella typhi* dan tanpa perlakuan pemberian tepung *Lumbricus rubellus*. Kelompok perlakuan yaitu kelompok *Rattus novergicus* terinfeksi *Salmonella typhi* yang diberi perlakuan pemberian tepung *Lumbricus rubellus* dengan dosis (32%, 48%, dan 60%) dan lama pemberian (7 dan 14 hari).

Setelah perlakuan tersebut dilakukan untuk pengambilan darah pada jantung yang digunakan untuk tes kadar enzim transaminase (SGPT dan SGOT) hepar *Rattus novergicus* yang terinfeksi *Salmonella typhi*.

Tabel 3.2 Kelompok Perlakuan *Rattus norvegicus* Percobaan

| Kelompok | Perlakuan Lama Pemberian |
|----------|--|
| 1 | Tikus putih kontrol negatif (tanpa perlakuan) |
| 2 | Tikus putih kontrol positif (terinfeksi <i>Salmonella typhi</i> tanpa pemberian tepung <i>Lumbricus rubellus</i>) |
| 3 | Tikus putih terinfeksi <i>Salmonella typhi</i> dengan pemberian tepung <i>Lumbricus rubellus</i> dosis 32% |
| 4 | Tikus putih terinfeksi <i>Salmonella typhi</i> dengan pemberian tepung <i>Lumbricus rubellus</i> dosis 48% |
| 5 | Tikus putih terinfeksi <i>Salmonella typhi</i> dengan pemberian tepung <i>Lumbricus rubellus</i> dosis 60% |
| 6 | Tikus putih terinfeksi <i>Salmonella typhi</i> dengan pemberian tepung <i>Lumbricus rubellus</i> dosis 32% |
| 7 | Tikus putih terinfeksi <i>Salmonella typhi</i> dengan pemberian tepung <i>Lumbricus rubellus</i> dosis 48% |
| 8 | Tikus putih terinfeksi <i>Salmonella typhi</i> dengan pemberian tepung <i>Lumbricus rubellus</i> dosis 60% |

3.6.5.3 Isolasi Darah Tikus Putih dan Tes Serologis

Tes serologis dilakukan sebanyak dua kali, yaitu sebelum penginfeksian *Salmonella typhi* (tes widal) dan setelah penginfeksian *Salmonella typhi* (tes widal). Prinsip pemeriksaan widal adalah bahwa antigen *Salmonella typhi* berikatan dengan antibodi *Salmonella typhi* dalam tubuh sehingga terjadi reaksi aglutinasi. Adapun metode tes

widal adalah sebagai berikut. Serum sebanyak 80 μl diambil menggunakan mikropipet kemudian ditambahkan 1 tetes reagen antigen, kemudian dicampur dan digoyang-goyang selama 2 menit dan diamati terbentuknya aglutinasi. Untuk cara semi kuantitatif dilakukan pengenceran dengan mengurangi volume pemipetan (40 μl , 20 μl , 10 μl , dan 5 μl). Sampel yang positif akan bereaksi dan memperlihatkan hasil reaksi berupa butiran-butiran aglutinasi. Untuk pembacaan titer semi kuantitatif, jumlah titer dibaca sampai pengenceran terkecil yang masih bereaksi memperlihatkan aglutinasi (Olsen, *et al.*, 2004).

3.6.5.4 Pengukuran SGPT dan SGOT

Pada pengukuran kadar SGPT dan SGOT, didahului dengan pengambilan darah melalui jantung (intra cardial) dengan alat suntik sebanyak ± 1 ml. Darah yang telah diambil dimasukkan dalam tabung venoject yang bersih dan kering, kemudian disentrifuge dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit. Serum yang terpisah diambil dan dimasukkan dalam tabung lainnya yang bersih, kering, dan ditutup. Jika serum tidak langsung diperiksa, maka harus disimpan pada lemari es suhu 2°C selama maksimal 4 hari, karena jika lebih dari 4 hari akan mengalami degradasi aktifitas sebesar 10 %.

Pengukuran aktivitas SGPT dan SGOT dilakukan pada masing-masing kelompok perlakuan setelah pemberian tepung *Lumbricus rubellus* selama 7 dan 14 hari. Pembuatan larutan pereaksi

dengan melarutkan tablet reagen dalam larutan buffer dengan perbandingan 1:10. Pengukuran aktifitas enzim SGPT dan SGOT dilakukan dengan mengambil serum sebanyak 50 μ l dan ditambahkan 500 μ l larutan pereaksi. Kemudian dihomogenkan dan ditunggu selama 1 menit sebelum diukur. Setelah 1 menit, diukur absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 340 nm, dan dicatat penurunan absorbansinya setiap menitnya selama 3 menit.

3.7 Teknik Pengambilan Data dan Analisis Data

3.7.1 Teknik Pengambilan Data Kadar SGPT dan SGOT

Data penelitian ini berupa pemeriksaan enzim transaminase hepar pada serum, data yang diperoleh dimasukkan dalam tabel sebagai berikut:

Tabel 3.3 Kadar SGPT pada Hepar Tikus Putih

| Perlakuan | Kadar SGPT (U/l) | | | |
|-----------|------------------|----|-----|----|
| | I | II | III | IV |
| 1. | | | | |
| 2. | | | | |
| 3. | | | | |
| 4. | | | | |
| 5. | | | | |
| 6. | | | | |
| 7. | | | | |
| 8. | | | | |

Table 3.4 Kadar SGOT pada Hepar Tikus Putih

| Perlakuan | Kadar SGOT (U/l) | | | |
|-----------|------------------|----|-----|----|
| | I | II | III | IV |
| 1. | | | | |
| 2. | | | | |
| 3. | | | | |
| 4. | | | | |
| 5. | | | | |
| 6. | | | | |
| 7. | | | | |
| 8. | | | | |

3.7.2 Analisis Data

Untuk mengetahui pengaruh pemberian tepung *Lumbricus rubellus* sebagai bahan antibakteri terhadap kadar enzim transaminase (SGPT dan SGOT) hepar *Rattus novergicus* yang terinfeksi *Salmonella typhi*, data hasil pengamatan yang sudah ditabulasi diuji statistik dengan uji ANOVA (*Analysis Of Variance*). Jika hasil uji ANOVA menunjukkan perbedaan yang signifikan maka dilanjutkan uji lanjut BNJ 1%.

3.8 Diagram Alir Pelaksanaan Penelitian

Diagram alir pelaksanaan penelitian ini adalah sebagai berikut:





Gambar 3.2 Diagram Alir Penelitian